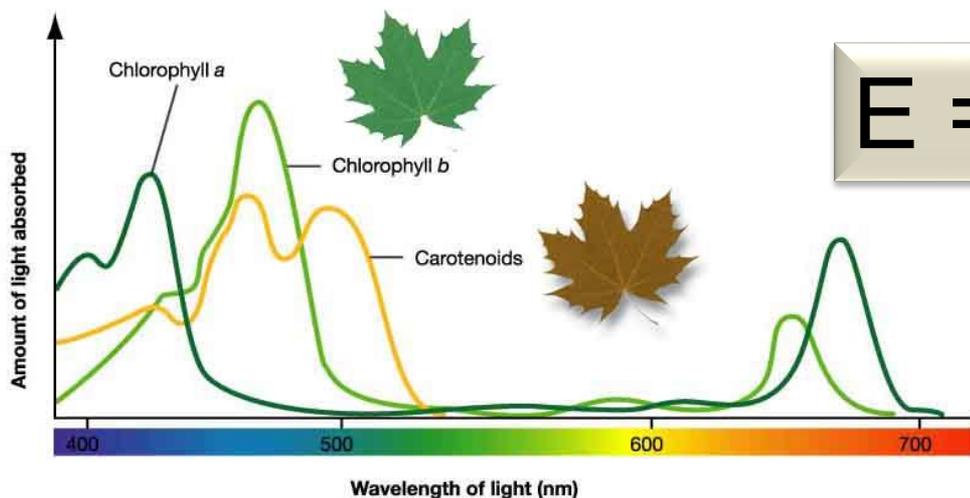


SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO

La spettrofotometria è il processo che determina la quantità di luce ($E - \nu - \lambda$) assorbita da composti disciolti **in soluzione**.

Ogni molecola ha precisi livelli energetici associati alla propria natura e legami chimici, perciò assorbirà la luce di λ (E) specifiche, fornendo spettri di assorbimento **unici**.



$$E = h \nu$$

$$\lambda = c/n\nu$$

Tramite essa è possibile uno studio **qualitativo** e **quantitativo**.

ANALISI QUALITATIVA: SPETTRO DI ASSORBIMENTO/EMISSIONE

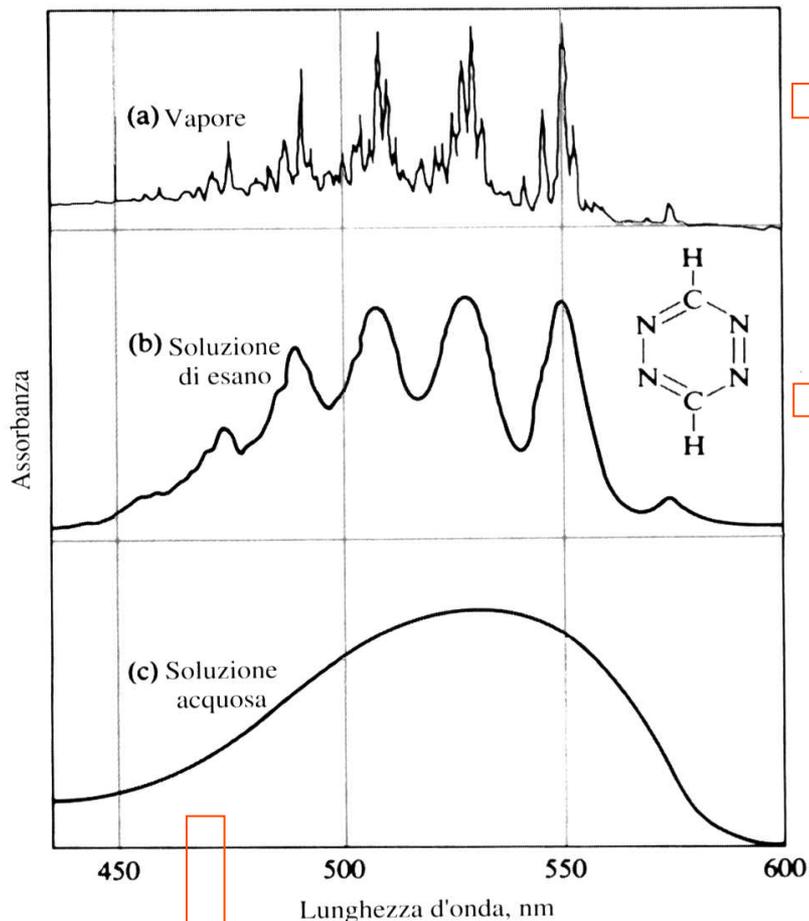
Un gruppo funzionale, un legame o un sistema di legami che assorbe è detto *cromoforo*.

L'intensità massima (picco) dello spettro di assorbimento I_{\max} è influenzata dal solvente e dal resto della molecola.

I **gruppi funzionali** possono essere **rivelati dagli shift** dovuti al solvente o a reattivi specifici. Tanto meno il solvente è polare tanto più lo spettro si avvicina a quello in fase di vapore.

ANALISI QUALITATIVA

1,2,4,5-tetrazina



In stato di vapore, le molecole non risentono di interazioni reciproche; si vedono le transizioni tra i vari stati vibrazionali e rotazionali.

Le linee dovute a differenze nei livelli energetici rotazionali sono cancellate. In presenza di un **solvente** le energie dei vari livelli vibrazionali sono modificate in modo irregolare: l'energia di un dato stato elettronico acquista la distribuzione "gaussiana".

In un solvente polare, come l'acqua, si ha un singolo picco di assorbimento arrotondato

ANALISI QUANTITATIVA

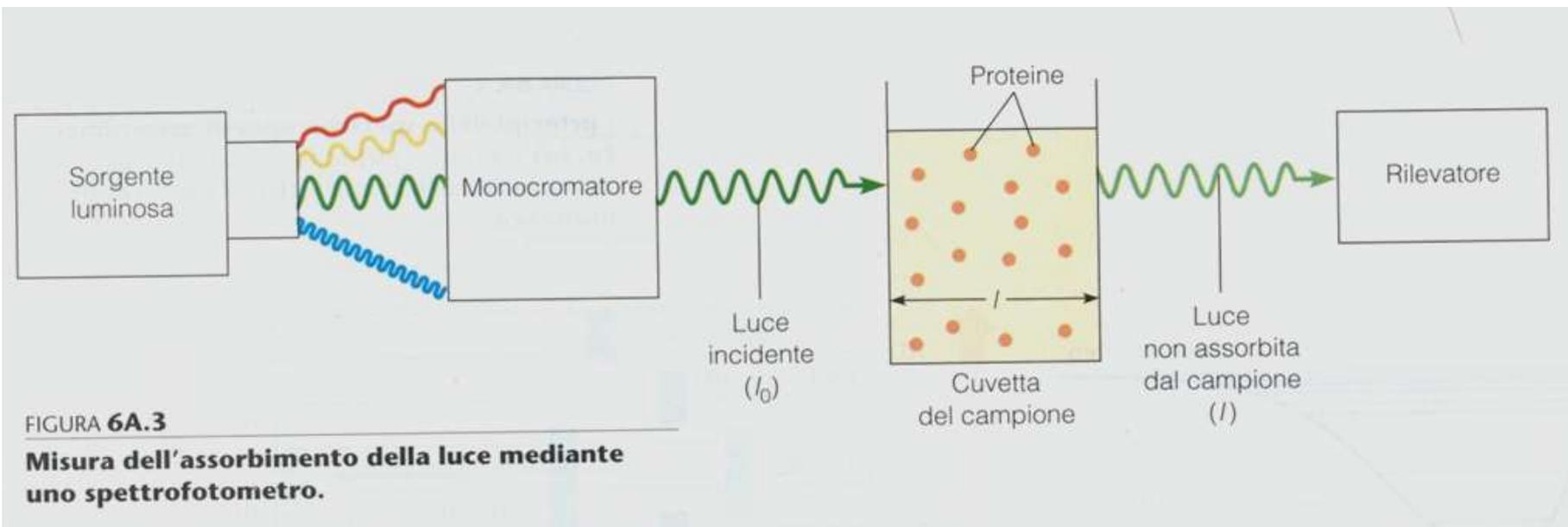
La **relazione tra assorbanza e concentrazione deve essere biunivoca** (cioè ad un segnale deve corrispondere una e una sola concentrazione) attraverso una relazione matematica di tipo:

- lineare (legge di Lambert-Beer, vedi dopo)
- di grado superiore al primo e, soprattutto in questo caso, ben nota da standard di calibrazione nel range di concentrazione esaminato.

La procedura deve essere standardizzata:

- scelta della **lunghezza d'onda** a cui effettuare la misura.
- **accuratezza e riproducibilità** dell'analisi.
- scelta del **metodo di calibrazione** più opportuno in funzione del tipo e della concentrazione dell'analita e del tipo di matrice: a. retta di calibrazione esterna, b. metodo dello standard interno, c. metodo delle aggiunte standard
- scelta delle migliori **condizioni operative** (es. interferenti devono essere schermati o eliminati; scelta del pH che stabilizza il cromoforo; stabilizzazione della specie da analizzare).

TRASMITTANZA E ASSORBANZA



$$\text{Trasmittanza} = T = I/I_0$$

$$\text{Assorbanza} = A = \log 1/T = \log I_0/I$$

$$\text{Assorbanza} = A = \varepsilon_{\lambda} cd$$

TRASMITTANZA E ASSORBANZA NELL'UV - VISIBILE

Legge di Lambert - Beer

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} \frac{P_0}{P} = \log_{10} \frac{I_0}{I} = abC = \epsilon bM$$

A: assorbanza

T: trasmittanza

P_0 , P: potenze radianti

I_0 , I: intensità del raggio

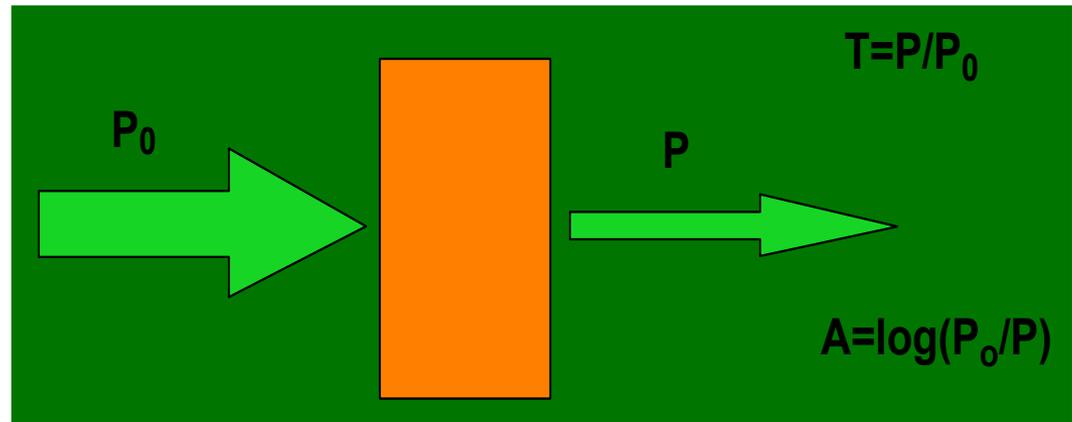
a: assorbanza specifica

b: cammino ottico

C: concentrazione

ϵ : coefficiente di assorbività molare o di estinzione molare o assorbanza specifica molare

M: molarità



LEGGE LAMBERT - BEER

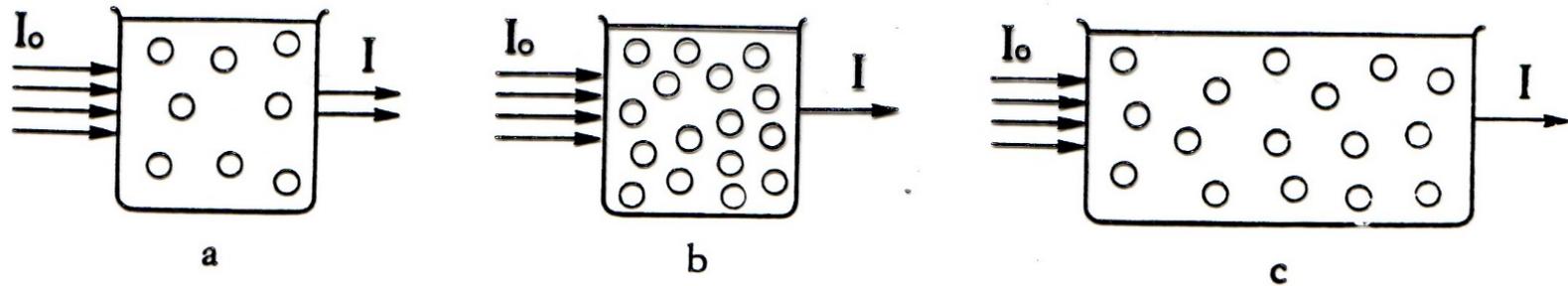


Fig. 4-10 - Assorbimento della luce in rapporto allo spessore e alla concentrazione.

$$A = \varepsilon b c$$

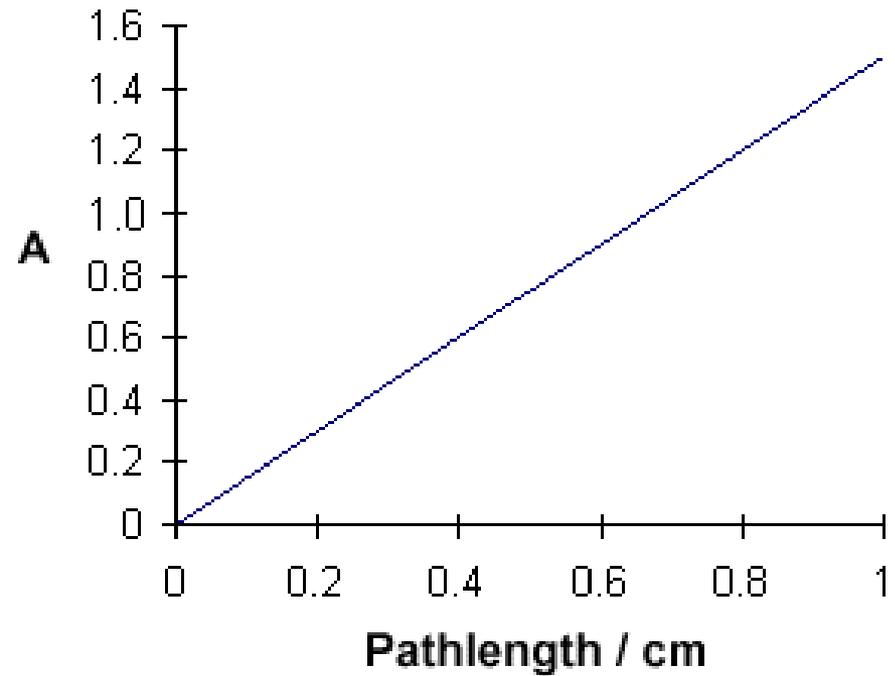
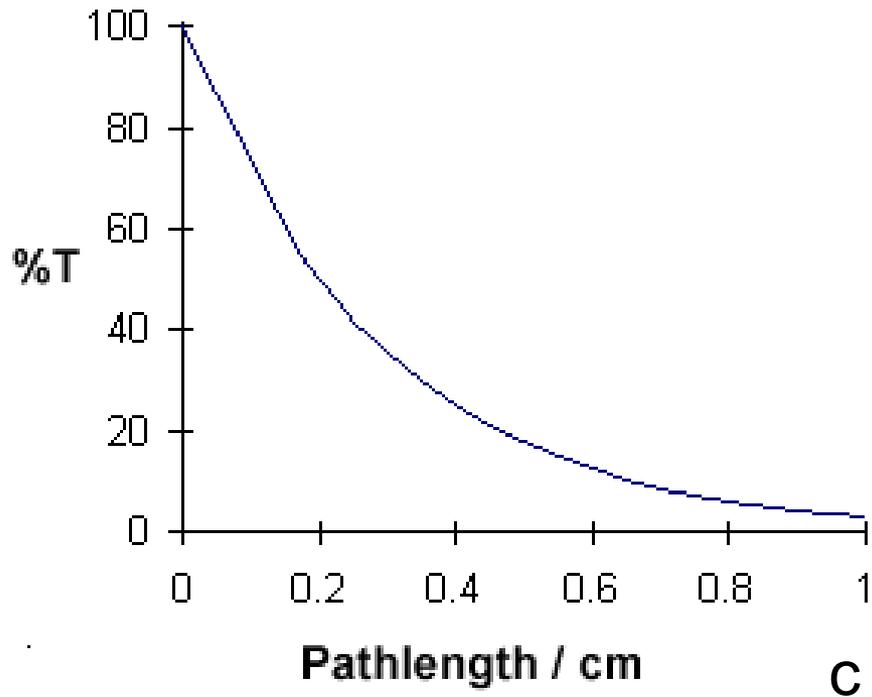
$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = \log \frac{1}{T}$$

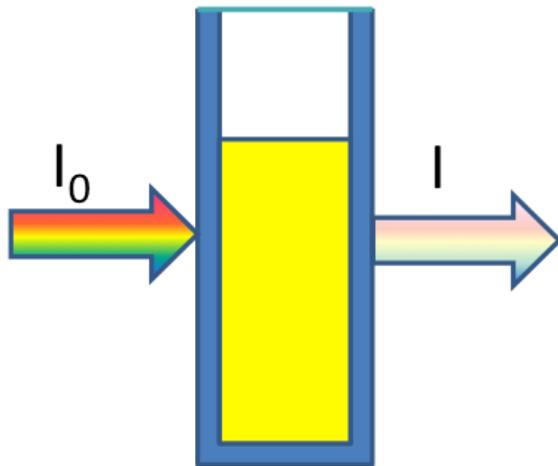
$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

LEGGE LAMBERT - BEER

Path length / cm	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
%T	100	50	25	12.5	6.25	3.125
Absorbance	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5



L'ASSORBIMENTO DI UNA SOLUZIONE



$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

Frazione di luce incidente trasmessa dalla soluzione.

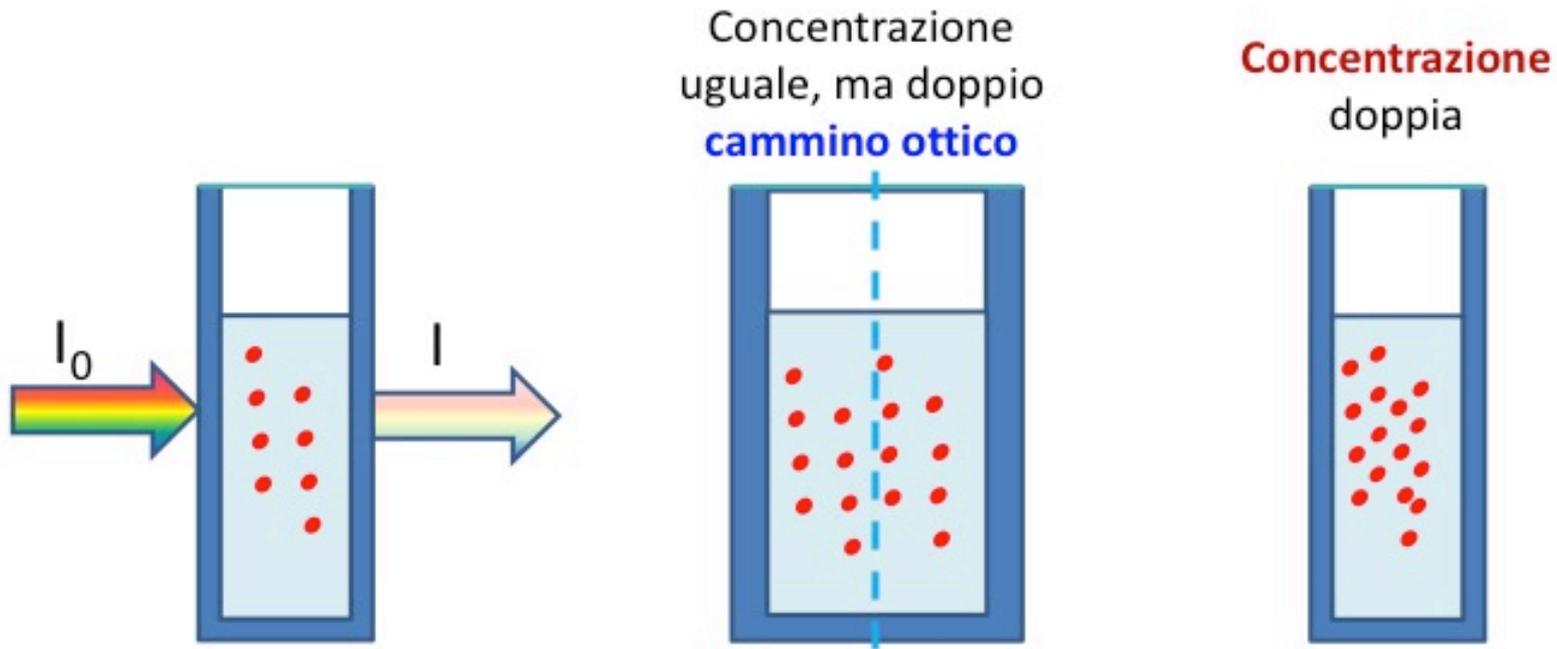
$$\text{Assorbanza (A)} = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

L'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche è descritto dalla legge (sperimentale) di **Lambert-Beer**:

$$A = \epsilon l c$$

La radiazione assorbita dipende dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono e dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento.

DA COSA DIPENDE L'ASSORBIMENTO

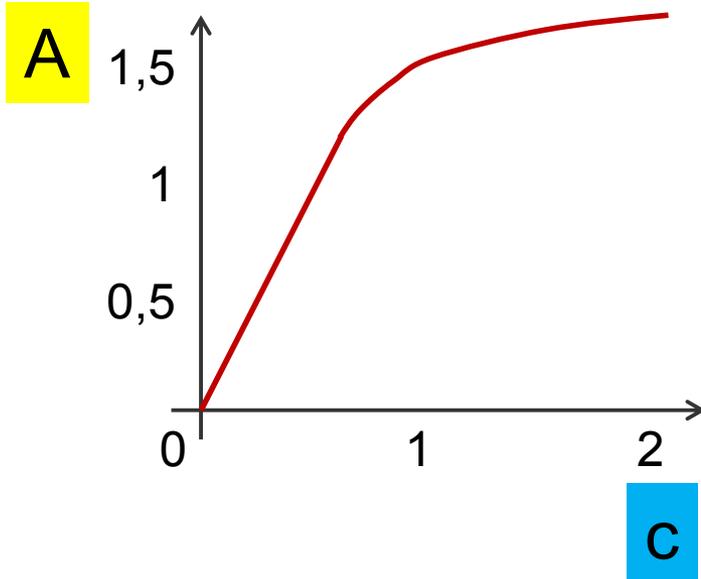
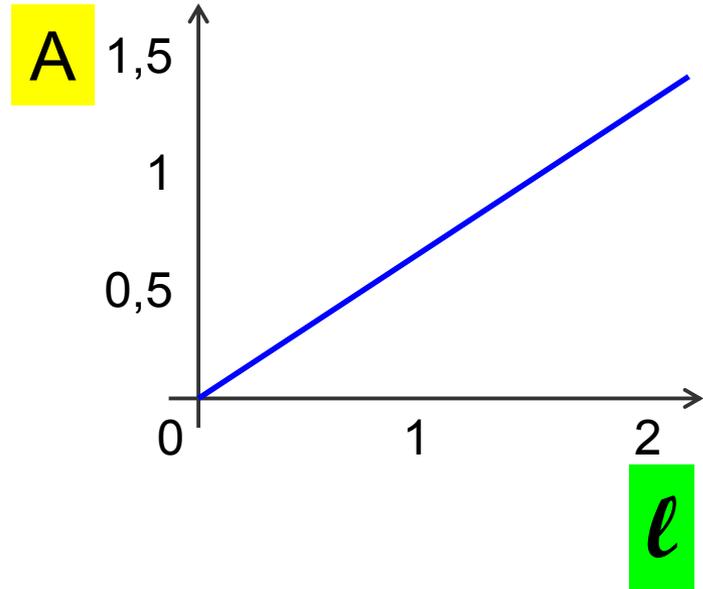


$$A = \epsilon l c$$

La radiazione assorbita dipende dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento e dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono.

L'ASSORBIMENTO IN FUNZIONE DEL CAMMINO OTTICO E DELLA CONCENTRAZIONE

Se si riporta l'assorbanza in funzione della lunghezza del cammino ottico:



La risposta dell'assorbanza in funzione della concentrazione è **lineare** solo entro un determinato intervallo di valori.

Che cos'è ϵ ?

$$A = \epsilon cl$$

$$\epsilon = A / cl$$

Se $l=1\text{cm}$ e $c=1\text{M}$ \longrightarrow $\epsilon = A$

Il coefficiente di estinzione molare (ϵ) rappresenta l'Assorbanza (o Densità Ottica) di una soluzione con concentrazione 1M e a cammino ottico unitario (1cm)

Che cos'è ϵ ?

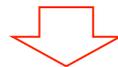
Natura
chimica

Lunghezza
d'onda λ

Temperatura
e solvente

$$A = \epsilon_{\lambda} l c$$

La radiazione assorbita dipende dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento, dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono e dipende ovviamente da come assorbe ogni sostanza in esame e dalle condizioni in cui si trova.



In particolare, ϵ rappresenta la sezione di cattura della radiazione da parte della particella "assorbente" e contiene la **sezione geometrica e la probabilità di transizione elettronica**

UTILITA' DELLA MISURAZIONE DELL'ASSORBIMENTO DI UNA SOLUZIONE

Utilizzo pratico della Lambert-Beer:

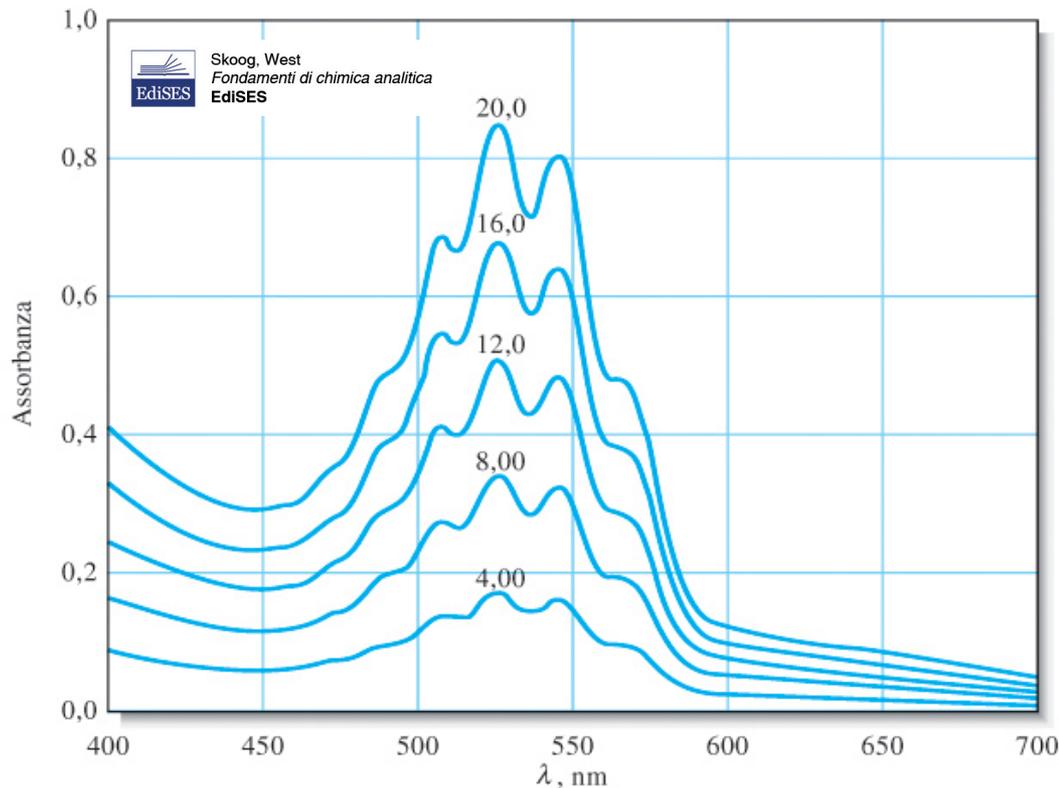
$$A = \epsilon l c$$



$$c = \frac{A}{\epsilon l}$$

Il coefficiente di estinzione molare rappresenta la **pendenza** della retta di calibrazione Assorbanza vs. Concentrazione (con cammino ottico unitario)

LEGGE LAMBERT – BEER: DIPENDENZA DALLA CONCENTRAZIONE



Tipici spettri di assorbimento del MnO_4^- a cinque diverse concentrazioni. I numeri adiacenti alle curve indicano la concentrazione del Mn in ppm. La specie assorbente è lo ione permanganato; il cammino ottico della cella è 1 cm.

Il grafico dell'assorbanza alla λ del picco a 525 nm in funzione della concentrazione è lineare e quindi la relazione soddisfa la legge di Lambert-Beer.

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Fattori fisici e chimici

- ➡ Concentrazioni troppo elevate. Si ha un cambiamento dell'indice di rifrazione
- ➡ Concentrazioni troppo elevate di assorbente ($C > 0,01 \text{ M}$) o di elettrolita
- ➡ Variazione del pH: $\text{HIn} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{In}^-$
- ➡ Temperatura. Può influire su un sistema in equilibrio chimico.
- ➡ Soluzioni torbide. Effetto scattering della luce.

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Fattori strumentali

- ➔ Solo con radiazioni monocromatiche si verifica un'aderenza stretta alla legge di Beer.
- ➔ Luce diffusa. La radiazione che esce dal monocromatore è contaminata da una piccola quantità di luce diffusa.
- ➔ Rumori strumentali

Se S è l'intensità di luce "spuria" proveniente dallo strumento:

$$A = \log \frac{I_0 + S}{I + S}$$

quando C aumenta, I
tende a zero



$$A = \log \frac{I_0 + S}{S}$$



L'errore influenza in modo
maggiore l'assorbanza

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Fattori strumentali: luce spuria

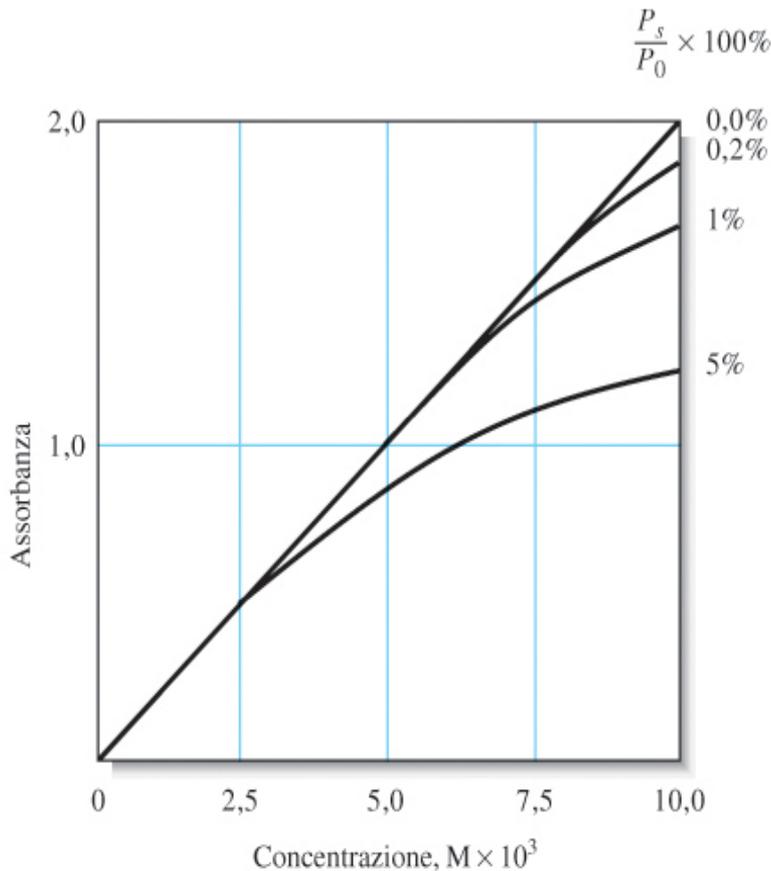
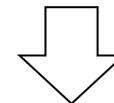


Figura 24-18 Deviazione dalla legge di Beer causata da diversi livelli di luce spuria. Si noti come ad alti livelli della luce spuria lo scostamento dalla legge di Beer inizi a concentrazioni più basse. La luce spuria limita sempre il massimo di assorbimento ottenibile poiché quando l'assorbanza è alta, la potenza radiante trasmessa dal campione può essere confrontabile o addirittura più bassa della radiazione spuria.



Skoog, West
Fondamenti di chimica analitica
EdiSES



Pertanto assorbanze oltre 1.5 – 1.8 non possono essere utilizzate a meno di non avere errori considerevoli

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Radiazione NON monocromatica

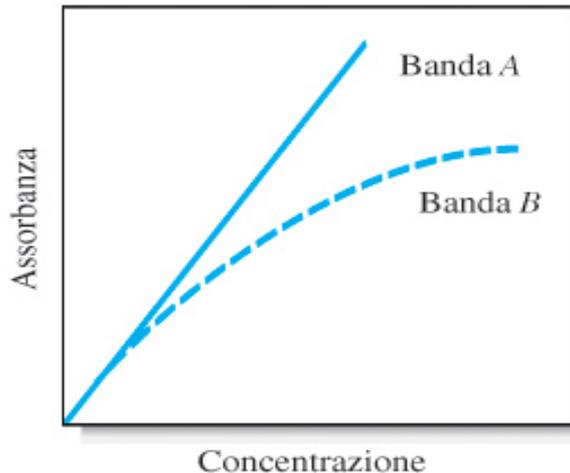
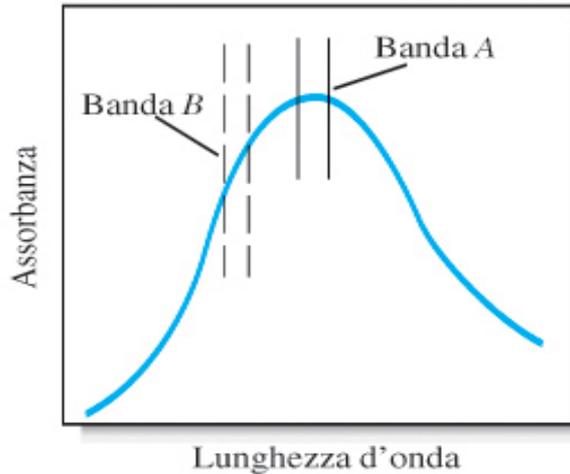


Figura 24-17 L'effetto della radiazione policromatica sulla legge di Beer. Nello spettro di assorbimento in alto, la banda A mostra una piccola deviazione poiché l'assorbanza specifica non cambia molto all'interno della banda. Si noti come usando la Banda A si abbia un grafico lineare della legge di Beer, riportato in basso. La Banda B dello spettro coincide con una regione nella quale l'assorbanza specifica dell'analita subisce delle variazioni. Si noti la marcata deviazione dalla legge di Beer osservabile nel grafico in basso.

La deviazione dalla linearità è dovuta al diverso assorbimento specifico a due λ diverse



Skoog, West
Fondamenti di chimica analitica
EdiSES

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Radiazione NON monocromatica

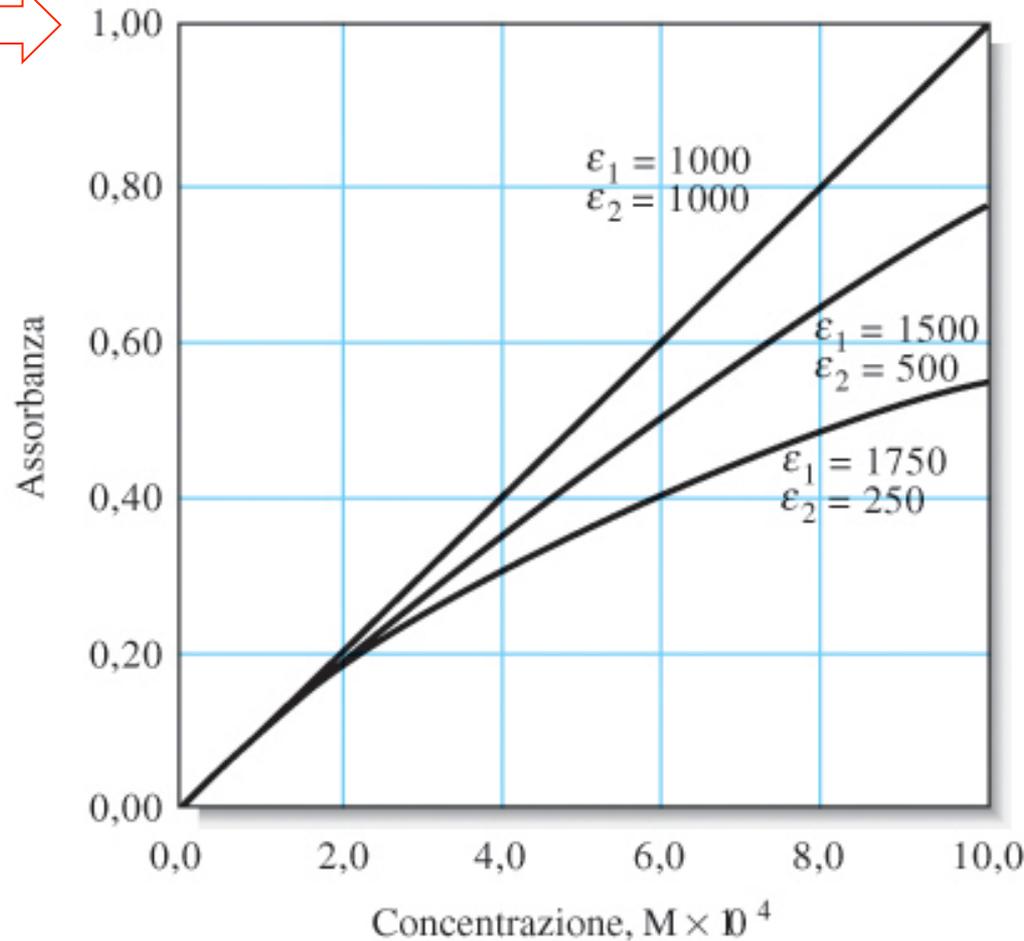


Figura 24-16 Deviazioni dalla legge di Beer con radiazione policromatica. L'assorbitore ha le assorbanze specifiche molari indicate alle due lunghezze d'onda λ' e λ'' .



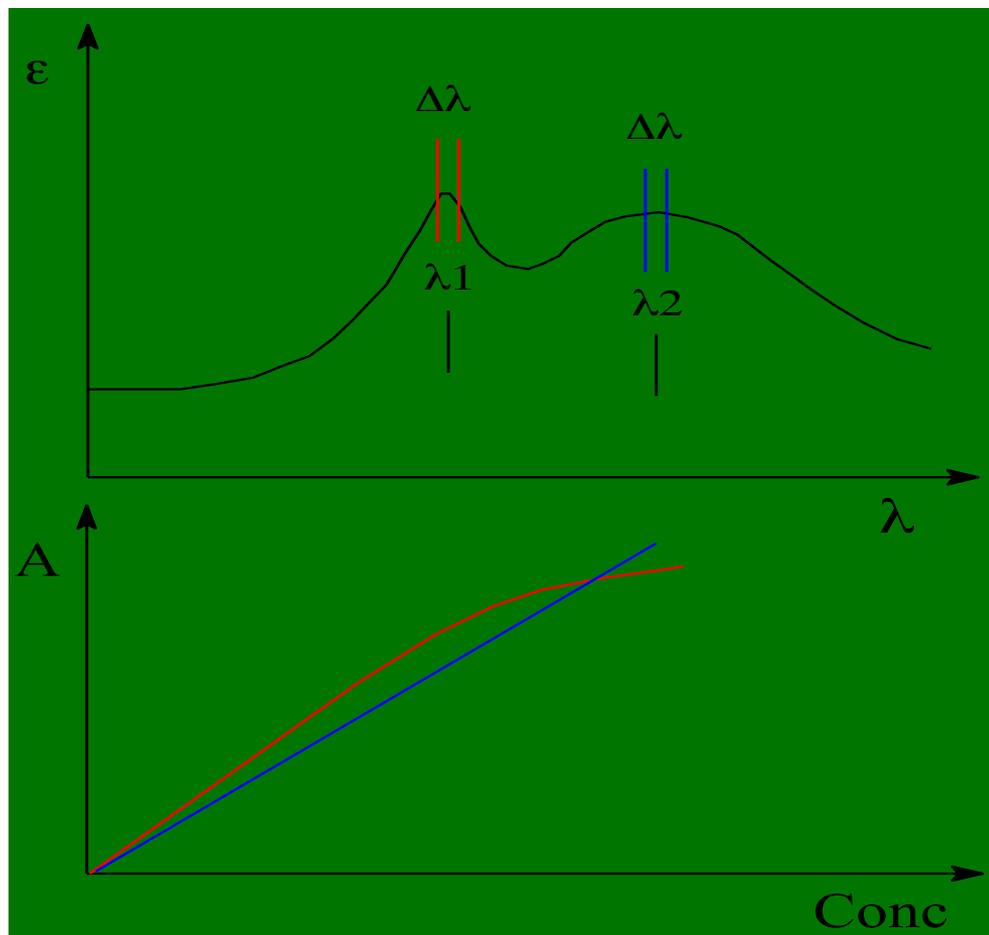
Skoog, West
Fondamenti di chimica analitica
EdiSES

Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Radiazione NON monocromatica

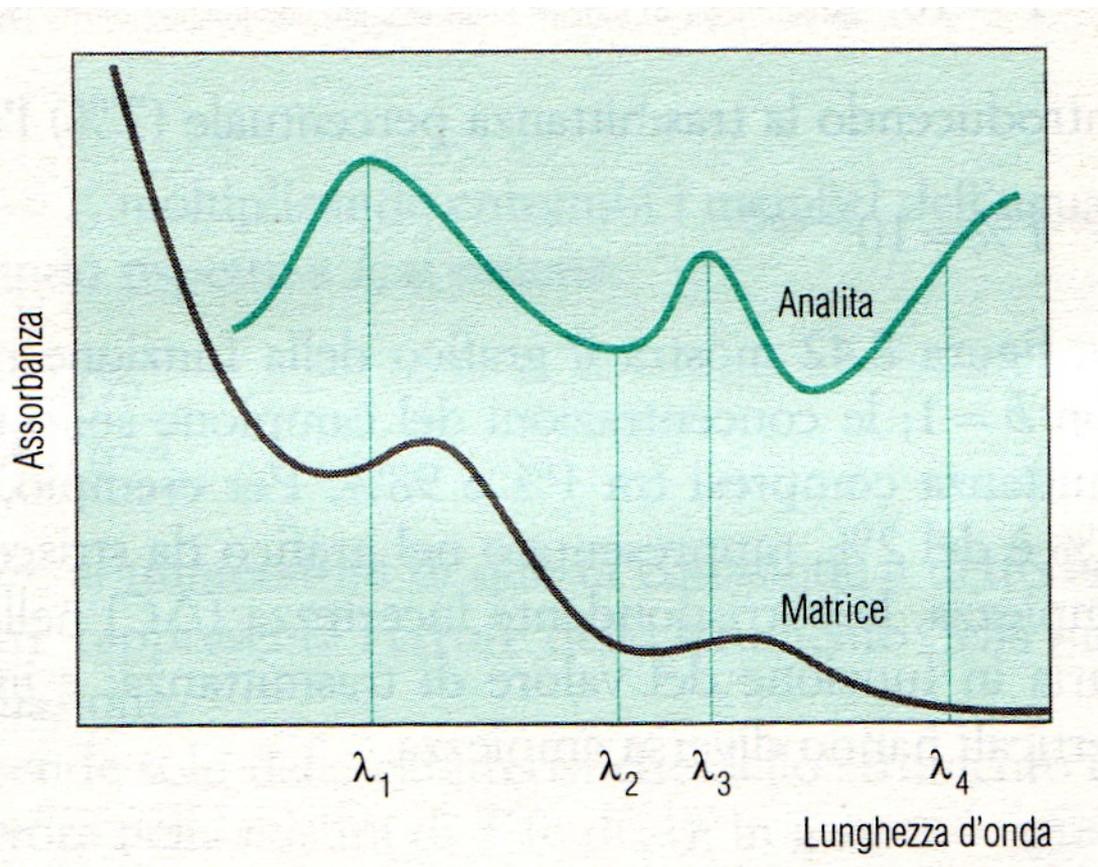
Il posizionamento della banda passante $\Delta\lambda$ a cavallo della lunghezza d'onda λ_2 , porta ad una retta di calibrazione con coefficiente angolare minore, ma senza deviazioni dalla linearità.

Nel caso di λ_1 si ha deviazione ad elevate concentrazioni in quanto la radiazione non è monocromatica e l'assorbività (assorbimento specifico) non è costante all'interno della banda passante.



Deviazioni dalla linearità della Legge di Beer

Effetto della matrice, bianco della misura



È fondamentale effettuare sempre una misura del bianco (cioè della matrice del campione priva dell'analita) oltre alla misura dell'assorbanza del campione (che contiene anche l'analita)

visto che le assorbance sono additive

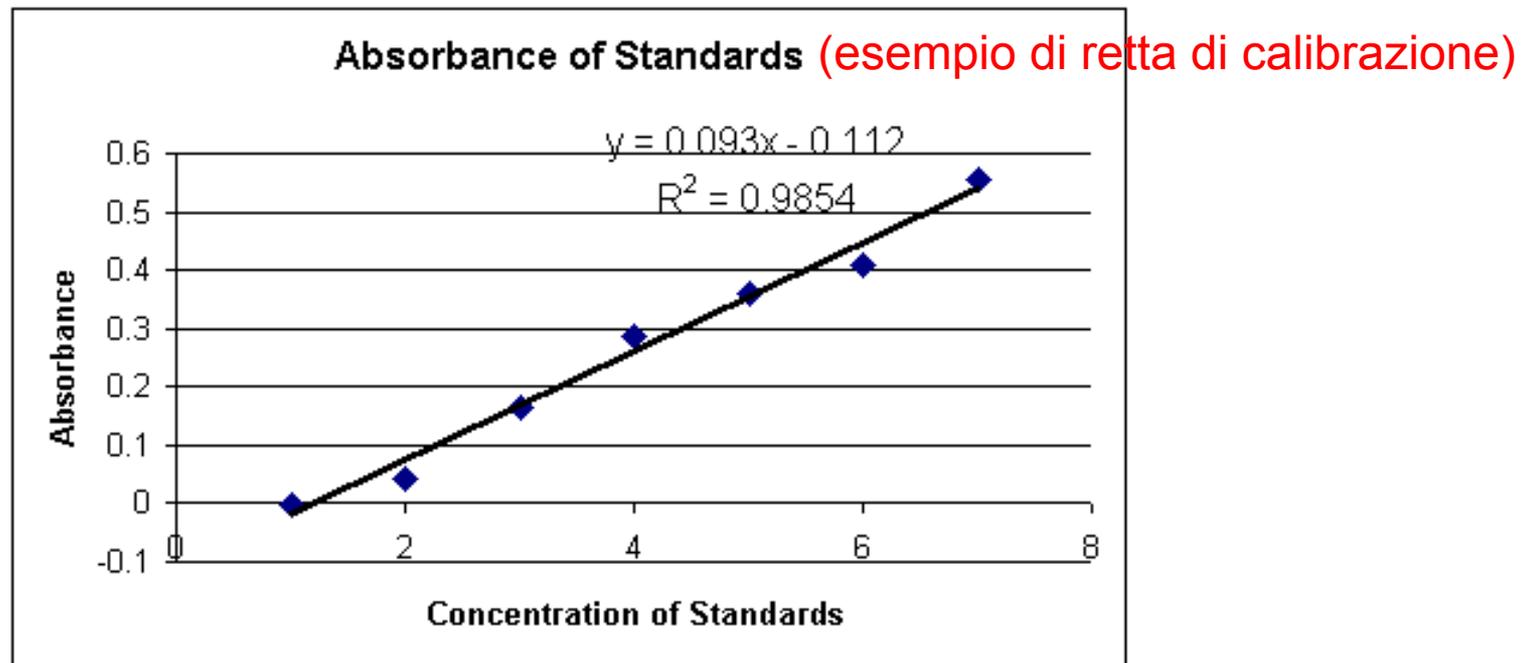
Non tenere conto della matrice può portare a deviazioni dalla linearità e anche ad errori per eccesso sulla concentrazione dell'analita.

Applicazioni quantitative spettrofotometria di assorbimento

- Ampia applicabilità
- Alta sensibilità: i limiti di rivelabilità variano da 10^{-4} a 10^{-5} M e si può arrivare anche a 10^{-6} e 10^{-7} M con accorgimenti.
- Selettività da moderata ad alta.
- Buona accuratezza. Gli errori con apparecchiature e procedure normali sono dell'ordine del 1-5%; con precauzioni fino a 0.1%.
- Facilità e convenienza.

Applicazioni quantitative spettrofotometria di assorbimento

- Selezione della lunghezza d'onda
- Ottimizzazione variabili che influenzano l'assorbanza (es. pH, mascheramento interferenti)
- Determinazione della relazione tra assorbanza e concentrazione con opportuno metodo di calibrazione



Applicazioni quantitative spettrofotometria di assorbimento: controllo di qualità degli alimenti

- ➡ Analisi VIS del colore negli estratti dei cibi.
- ➡ Determinazione UV della caffeina, della vitamina A e dell'acido benzoico (conservante).
- ➡ Determinazione dell'azoto nitroso nelle acque
- ➡ Determinazione enzimatica degli zuccheri.
- ➡ Determinazione di tracce di ioni di metallici tossici mediante misurazione dell'assorbimento dei complessi formati dai metalli con opportuni leganti (esempio tipico è la determinazione colorimetrica del Cr(VI) nelle acque con un metodo standard EPA e del Fe II con 1,10 N - fenantrolina).
- ➡ Valutazione merceologica dello zafferano.
- ➡ ...

Saggi colorimetrici di impiego comune (1)

Sostanza	Reagente	λ (nm)
Fosfato inorganico	Molibdato d'ammonio, H_2SO_4 , 1,2,4-aminonaftolo, $NaHSO_3$, Na_2SO_3	600
Aminoacidi	(a) Ninidrina	570 (prolina 420)
	(b) Sali rameici	620
Legami peptidici	Biureto (tampone tartrato alcalino, sale rameico)	540
Fenoli, tirosina	Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sale rameico)	660 o 750 (750 più sensibile)
Proteine	(a) Folin	660
	(b) Biureto	540
	(c) Reagente BCA (acido bicinconinico)	562
	(d) Coomassie Brilliant Blue	595
Carboidrati	(a) Fenolo, H_2SO_4	Variabile, per esempio glucosio 490, xilosio 480
	(b) Antrone (antrone, H_2SO_4)	620 o 625
Zuccheri riducenti	Dinitrosalicilato, tampone tartrato alcalino	540
Pentosi	(a) Bial (orcinolo, etanolo, $FeCl_3$, HCl)	665
	(b) Cisteina, H_2SO_4	380-415
Esosi	(a) Carbazolo, etanolo, H_2SO_4	540 o 440
	(b) Cisteina, H_2SO_4	380-415
	(c) Arsenomolibdato	Di solito 500-570

Saggi colorimetrici di impiego comune (2)

Sostanza	Reagente	λ (nm)
Glucosio	Glucosio ossidasi, perossidasi, o-dianisidina, tampone fosfato	420
Chetoesosi	(a) Resorcinolo, tiurea, acido acetico, HCl	520
	(b) Carbazolo, etanolo, cisteina, H ₂ SO ₄	560
	(c) Difenilamina, etanolo, acido acetico, HCl	635
Esosoamine	Ehrlich (aldeide dimetilamino benzoica, etanolo, HCl)	530
DNA	Difenilamina	595
RNA	Bial (orcinolo, etanolo, FeCl ₃ , HCl)	665
α -chetoacidi	Dinitrofenilidrazina, Na ₂ CO ₃ , acetato di etile	435
Steroli	Reattivo di Liebermann-Burchardt (anidride acetica, H ₂ SO ₄ , cloroformio)	625
Ormoni steroidei	Reattivo di Liebermann-Burchardt	425
Colesterolo	Colesterolo ossidasi, perossidasi, 4-aminoantipirina, fenolo	500

Esempio di applicazione: determinazione della concentrazione dei COLORANTI negli alimenti

I COLORANTI sono sostanze (organiche o inorganiche) che miscelate ad altre sostanze conferiscono al preparato una determinata colorazione.

Ogni colorante è identificato da un codice numerico denominato **COLOUR INDEX**, nato nel 1925 e continuamente aggiornato, e inserito in un registro dei coloranti.

In base al Colour Index i coloranti sono suddivisi in quattro grandi gruppi:

- coloranti organici di sintesi (n. 10000 – 74999);
- coloranti organici naturali (n. 75000 al 75999);
- basi ad ossidazione e nitrocoloranti (n. 76000 - 76999);
- pigmenti inorganici (n. 77000 - 77999).



Regolamento Parlamento Europeo sugli Additivi Alimentari: definizione di Coloranti

*“I «coloranti» sono sostanze che conferiscono un **colore a un alimento** o ne restituiscono la colorazione originaria, e includono componenti naturali degli alimenti e altri elementi di origine naturale, normalmente non consumati come alimento né usati come ingrediente tipico degli alimenti. Sono coloranti ai sensi del presente regolamento le preparazioni ottenute da alimenti e altri materiali commestibili di base **di origine naturale** ricavati mediante procedimento fisico e/o chimico che comporti **l'estrazione selettiva dei pigmenti** in relazione ai loro componenti nutritivi o aromatici.”*

<http://www.minerva.unito.it/Chimica&Industria/Dizionario/Supplementi02/AdditiviAlimentari/AdditiviIndice.htm>

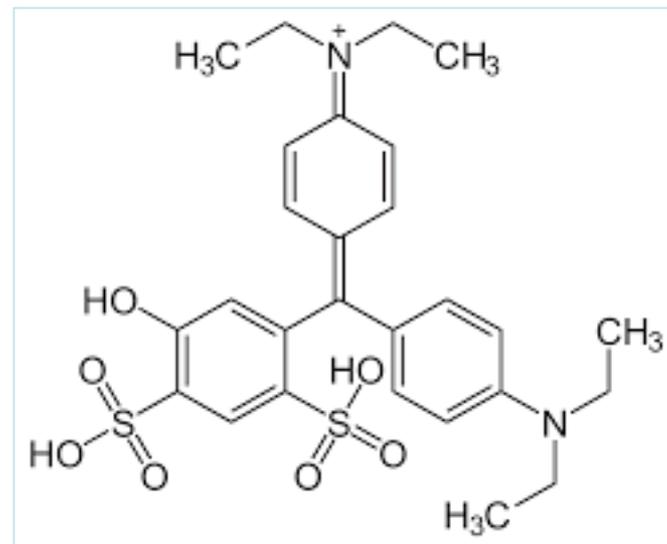
Esempio: E131 - Patent Blue V (C.I. 42051)

Il Blu patentato V è un colorante di colore blu, di tipo **sintetico**, utilizzato in moltissimi prodotti, come caramelle, sciroppi, liquori, bevande, glasse, gelati e ghiaccioli.

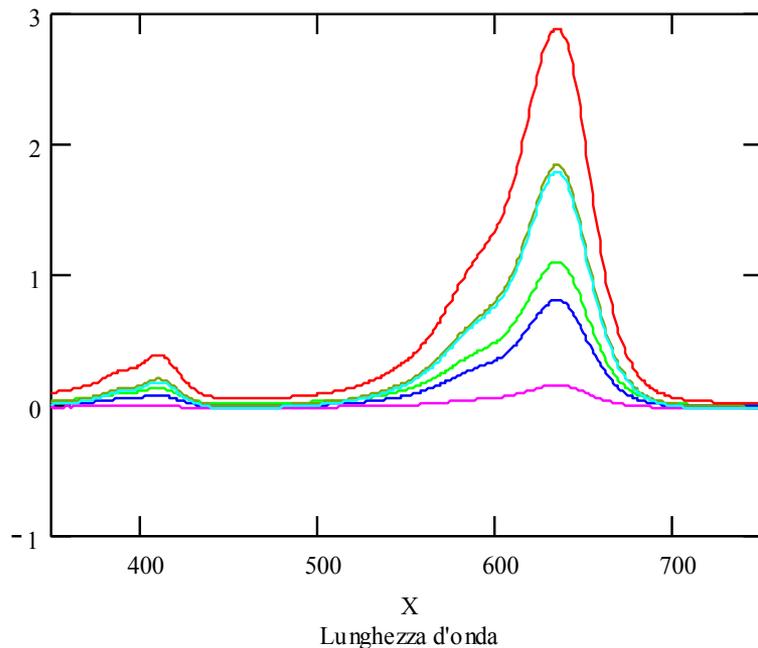
Attualmente sono disponibili pochi dati sugli effetti che produce sulla salute umana ma sono stati riportati casi di abbassamento della pressione sanguigna ed episodi di tremore. Nelle persone allergiche può causare sensibilizzazione della pelle, orticaria, prurito, nausea e insonnia.

E' sospetto cancerogeno.

Attualmente ne è vietato l'utilizzo in Australia



Esempio di applicazione: determinazione della concentrazione del colorante sintetico E131



Spettri VIS del colorante E131:

◆ $C = 3.3 \cdot 10^{-5} M$

◆ $C = 2.6 \cdot 10^{-5} M$

◆ $C = 2.2 \cdot 10^{-5} M$

◆ $C = 1.4 \cdot 10^{-5} M$

◆ $C = 1.1 \cdot 10^{-5} M$

◆ $C = 2.2 \cdot 10^{-6} M$

Spettri UV del colorante E131:

◆ $C = 5.0 \cdot 10^{-6} M$

◆ $C = 6.3 \cdot 10^{-6} M$

◆ $C = 7.9 \cdot 10^{-6} M$

◆ $C = 1.1 \cdot 10^{-5} M$

